

# INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DE FRAÇÕES DE *Ocotea glaziovii*

**Janaína da Silva Ribeiro<sup>1</sup>; Mariana Borges Botura<sup>2</sup>; Raquel Bianca Marchesine de Almeida<sup>3</sup> e Rodrigo Souza Conceição<sup>4</sup>**

1. Bolsista FAPESB, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: janaafsa@gmail.com

2. Orientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mbbotura@uefs.br

3. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: raquelbma87@gmail.com

4. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rodrigoszcz@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** *Ocotea*, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase

## INTRODUÇÃO

Os fármacos com ação anticolinesterásica têm sido utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas à déficits de acetilcolina, principalmente da doença de Alzheimer. A maioria dos medicamentos disponíveis possuem afinidade apenas para a acetilcolinesterase (AChE), porém substâncias com capacidade de atuar sobre as duas colinesterases podem potencializar e prolongar o benefício do tratamento anticolinesterásico (Freitas *et al.*, 2009).

O gênero *Ocotea* representa um dos principais membros da família Lauraceae. No Brasil, este gênero é representado por cerca de 170 espécies distribuídas em várias regiões do Brasil, inclusive no Nordeste (Brotto e Baitello, 2012). Dentre as atividades biológicas relatadas para algumas espécies de *Ocotea*, pode-se destacar o efeito carrapaticida (Conceição *et al.*, 2017) e anticolinesterásico (Amoo *et al.*, 2012).

Uma importante espécie do gênero *Ocotea*, é a *Ocotea glaziovii* (Mez), que possui como principal metabólito secundário um alcaloide proaporfínico, conhecido como glaziovina. Este alcaloide foi isolado pela primeira vez por Gilbert e cols. (1965) a partir da *O. glaziovii*. A esta substância foram atribuídas propriedades ansiolítica e tranquilizante, sendo registrada com o nome comercial de Suavedol® nos anos 70 como uma especialidade terapêutica do laboratório SIMES (Peréz *et al.*, 2005). Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa revelaram potencial atividade *in vitro* de diferentes extratos de *O. glaziovii* frente as colinesterases. O presente trabalho teve como objetivos avaliar *in vitro* o efeito inibitório de frações obtidas do extrato etanólico de *Ocotea glaziovii* frente as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE).

## METODOLOGIA

**Coleta e identificação botânica:** Folhas de *O. glaziovii* (aproximadamente 2 Kg) foram coletadas na região de Morro do Chapéu e identificadas no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), onde foi depositada a exsicata de número 205863.

**Obtenção do extrato etanólico:** O material vegetal foi seco em estufa com temperatura controlada (40°C) e moído em moinho de facas (tipo Wiley). O material moído foi submetido à maceração com etanol e posteriormente filtrado. O extrato etanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila. Após este procedimento, os respectivos solventes foram evaporados utilizando rotoevaporador rotativo.

**Fracionamento do extrato etanólico de *Ocotea glaziovii*:** O extrato etanólico de *O. glaziovii* (20 g) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna (CC) utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh, VETEC) como fase estacionária. O material foi eluído com os solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade para obtenção das frações, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Solventes utilizados no fracionamento do extrato etanólico de *Ocotea glaziovii* por cromatografia em coluna aberta e frações obtidas

| Solvente                            | Fração                               |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Hexano (100%)                       | Fração 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7          |
| Hexano - acetato de etila (90: 10%) | Fração 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 |
| Hexano - acetato de etila (80: 20%) | Fração 16 e 17                       |
| Hexano - acetato de etila (70: 30%) | Fração 18, 19, 20, 21, 23, 24        |
| Hexano - acetato de etila (60: 40%) | Fração 25 e 26                       |
| Hexano - acetato de etila (50: 50%) | Fração 27,28 e 29                    |
| Hexano - acetato de etila (40: 60%) | Fração 30, 31 e 32                   |
| Hexano - acetato de etila (30: 70%) | Fração 33                            |
| Hexano - acetato de etila (20: 80%) | Fração 34 e 35                       |
| Hexano - acetato de etila (10: 90%) | Fração 36, 37 e 38                   |
| Hexano - acetato de etila (3: 97%)  | Fração 40, 41, 42 e 43, 44 e 45      |
| Acetato de etila (100%)             | Fração 46,47, 48, 49, 50, 51 e 52    |

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como eluente os seguintes sistemas de solvente: acetato de etila/hexano (5:5), acetato de etila/hexano (7:3), acetato de etila/hexano (8:2). Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio (Merck), que permitem a visualização em UV (254 nm). As frações 1 e 2; 3, 4, 5, 6, 7 e 8; 9, 10 e 11; 12, 13 e 14; 15 foram unidas por apresentarem perfil similar nesta análise, resultando em cinco frações.

**Avaliação *in vitro* da inibição da atividade anticolinesterásica:** O efeito das frações de *O. glaziovii* sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foi avaliado de acordo com o método de Ellman (1961) e modificado por Tan *et al.* (2014). Nos poços de microplacas (96 poços) foram adicionados 140µL de solução tampão fosfato contendo albumina sérica bovina (0,1%), 20 µL das frações em diferentes concentrações (diluídos em etanol a 10%), 20 µL das enzimas (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase 0,15 U/mL), e a placa foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 10 µL de solução de iodeto de acetilcolina (75nM), 10 µL de solução de iodeto de butirilticolina (14 mM) e 10 µL de DTNB (10 mM). A eserina (50 µM) foi utilizada como controle positivo e os controles negativos consistiram na solução tampão fosfato 0,1 M e etanol (1%). A absorbância foi medida a 405 nm em leitor de microplaca nos tempos de 0 e 30 minutos. A porcentagem de inibição da colinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao controle negativo.

**Análise Estatística:** Os resultados foram avaliados pela ANOVA seguido do teste de Tukey ( $p < 0,001$ ), utilizando o programa estatístico Graphprism (versão 5.0).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação *in vitro* do efeito inibitório das frações obtidas do extrato etanólico de *O. glaziovii* sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE), foi observado, na concentração testada (2 mg/mL), os seguintes percentuais de inibição: 44,26; 38,34; 6,00; 23,09 e 34,36% para as frações 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Figura 1). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo (etanol 2%) ( $p < 0,001$ ).

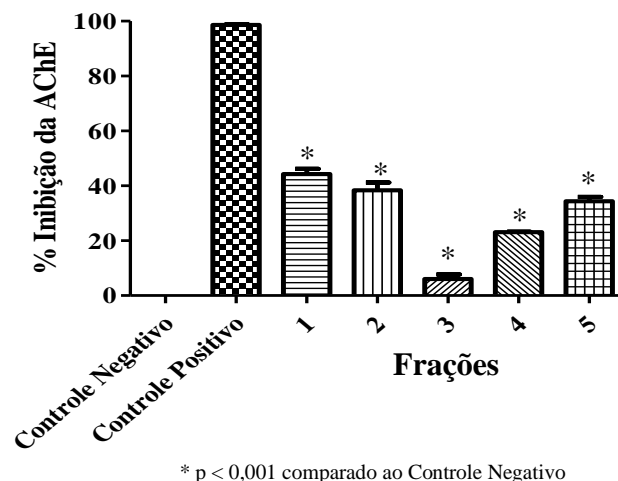


Figura 1: Média e desvio padrão do percentual de inibição da atividade da acetilcolinesterase após exposição as frações de *Ocotea glaziovii*

As frações de *O. glaziovii* exibiram maior efeito inibitório *in vitro* sobre a atividade da BuChE, com exceção da fração 3. Os percentuais de inibição corresponderam a 81,18; 34,59; 5,67; 52,85 e 55,07% para as frações 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente (Figura 2). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo (etanol 2%) ( $p < 0,001$ ).

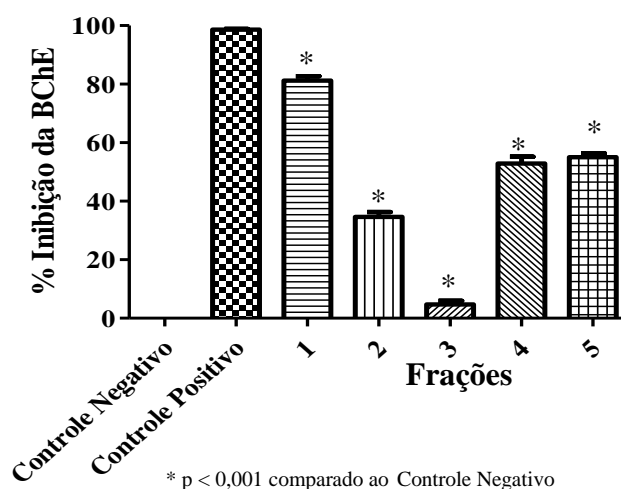


Figura 2: Média e desvio padrão do percentual de inibição da atividade da butirilcolinesterase após exposição as frações de *Ocotea glaziovii*

De acordo com Vinutha *et al.* (2007), a atividade anticolinesterásica de um extrato pode ser considerada como potente quando o percentual de inibição da atividade enzimática for maior ou igual a 50%, moderada quando estiver entre 30 e 50% e fraca quando for menor que 30%. No presente estudo, os tratamentos com a fração 1 e fração 5 de *O. glaziovii* resultaram em inibição da BuChE superior a 50% (Figura 2), enquanto que a inibição da AChE foi inferior a 50% para todas as frações (Figura 1). Maior sensibilidade da enzima BuChE aos efeitos das frações podem estar relacionadas com as diferenças estruturais entre as colinesterases.

A atividade anticolinesterásica dos extratos de *Ocotea glaziovii* foi avaliada por Lima (2016) e o extrato etanólico, utilizado para obtenção das frações deste estudo, foi o mais ativo com efeito inibitório igual a 99,3% e 87,7% frente a AChE e BuChE, respectivamente.

Considerando estes dados, observa-se que as frações apresentaram menor atividade em relação ao extrato do qual foram obtidas. Esse resultado sugere uma possível ação sinérgica de diferentes compostos nesta atividade biológica.

Dentre os possíveis compostos bioativos presentes na espécie *O. glaziovii* é a glaziovina (alcaloide proaporfínico), que tem sido relacionado com diferentes atividades biológicas desta planta, incluindo ansiolítica e antiulcerosa (Pérez *et al.*, 2005). Estudo anterior realizado por Yamaguchi, Alcântara e Veiga Júnior (2012) também identificou atividade anticolinesterásica de extratos etanólicos de folhas e galhos em diferentes espécies de *Ocotea*, como *O. minor*, *O. leucoxylon* e *O. ceanothifolia*. Estes autores correlacionaram o efeito anticolinesterásico com a presença de alcaloides nas espécies de *Ocotea*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a espécie *O. glaziovii* possui pronunciado efeito inibitório *in vitro* frente a enzima butirilcolinesterase, sendo a fração 1 a mais ativa.

Este trabalho identificou importante atividade biológica em espécie de *Ocotea*, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores das colinesterases. No entanto, torna-se necessário a realização de novos estudos farmacológicos, toxicológicos e isolamento das substâncias bioativas para melhor caracterização de seus potenciais efeitos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- AMOO, S.O. 2012. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(1): 1-9.
- BROTTO, M.L.; BAITELLO, J.B. 2012. Uma espécie nova de Lauraceae da floresta atlântica do Brasil. *Rodriguésia* 63(3): 579-585.
- CONCEIÇÃO, R.S. 2017. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. *Ticks and Tick-borne Diseases* 8: 275-282.
- ELLMAN, G.L. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* (7): 88-95.
- FREITAS, H.F.; PAZ, O.S.; CASTILHO, M.S. 2009. Estudos de QSAR 3D para um conjunto de inibidores de butirilcolinesterase humana. *Química Nova* 32(8): 13-22.
- GILBERT, B.; GILBERT, M.E.A.; RIBEIRO, O.; HOLLSTEIN, U.; WICKBERG, B.; WENKERT, E.; OLIVEIRA, M.M.; RAPOPORT, H. 1965. *Journal of the American Chemical Society* 86(1): 694.
- LIMA, F.A. 2016. Determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica de extratos de *Ocotea glaziovii*. Universidade Estadual de Feira de Santana, Monografia.
- PÉREZ, E.G.; SÁEZ, J.; CASSELS, B.K. 2005. A convenient, renewable source of the anxiolytic proaporphine alkaloid glaziovine: *Duguetia vallicola* leaves. *Journal of the Chilean Chemical Society* 50(3): 553-557.
- TAN, W.N.; KHAIRUDDEAN, M.; WONG, K.C.; KHAW, K.Y.; VIKNESWARAN, M. 2014. New cholinesterase inhibitors from *Garcinia atroviridis*. *Fitoterapia* 97: 261-267.
- VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S.L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMITA, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 109(3) 65-71.
- YAMAGUCHI, K.K.L.; ALCÂNTARA, J.M.; VEIGA JÚNIOR, V.F. 2012. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta Amazonica*. 42(2): 541-546.